

Enzymatyczna hydroliza skrobi do syropów maltodekstrynowych i skrobiowych.

Część II. Procesy

Jolanta Bryjak
Instytut Inżynierii Chemicznej
Politechnika Wrocławska
Wrocław

1. Wprowadzenie

Enzymatyczna hydroliza skrobi i izomeryzacja D-glukozy do D-fruktozy nie tylko wyparły procesy kwasowej degradacji skrobi i alkalicznej izomeryzacji glukozy, ale dzięki wysokiej specyficzności enzymów amylolitycznych pozwoliły na otrzymywanie szerokiej gamy syropów skrobiowych i maltodekstrynowych. Zgodnie z nazewnictwem zalecanym przez FDA (Food and Drug Administration) [1], syropy maltodekstrynowe to mieszanina glukozy, maltooligosacharydów o stopniu polimeryzacji (DP) od 2 do 10 reszt glukozy oraz dekstryn, przy czym te ostatnie powinny stanowić od 75 do 96%, przy równoważniku dekstrozowym (DE) mniejszym od 20. Syropy skrobiowe o wartości $DE \geq 20$ są reprezentowane przez wiele preparatów: syropy maltozowe, glukozy (dekstrozowe), fruktozowe, syropy zawierające cyklodekstryny czy maltooligosacharydy. Do procesów klasycznych należy obecnie zaliczyć produkcję syropów maltodekstrynowych, glukozy i fruktozy z udziałem kolejno α -amylaz, glukoamylaz i izomeraz glukozy. Procesy nowsze i praktycznie niemożliwe do przeprowadzenia metodami chemicznymi, to produkcja syropów maltozowych, maltooligosacharydowych, izomaltooligosacharydowych oraz cyklodekstryn i należy sądzić, że lista ta nie jest zamknięta.

Wziawszy pod uwagę smak i zdolność trawienia przez organizm ludzki głównych składników syropów otrzymywanych ze skrobi, charakteryzują się one dużą różnorodnością „słodkości” i kaloryczności. Służą zatem do produkcji żywności i napojów tak nisko-, jak i wysokokalorycznych i o zróżnicowanej słodkości [1-4]. Wysoko oczyszczone syropy znalazły również zastosowanie w medycynie jako związki ograniczające utlenianie, preparaty odżywcze i stabilizatory oraz nośniki wielu leków. Znane są ich właściwości ograniczające formowanie kryształów lodu czy możliwość zastępowania tłuszczów w żywności. Regulują wilgotność przetworów spożywczych oraz pełnią funkcje wypełniaczy i plastyfikatorów.

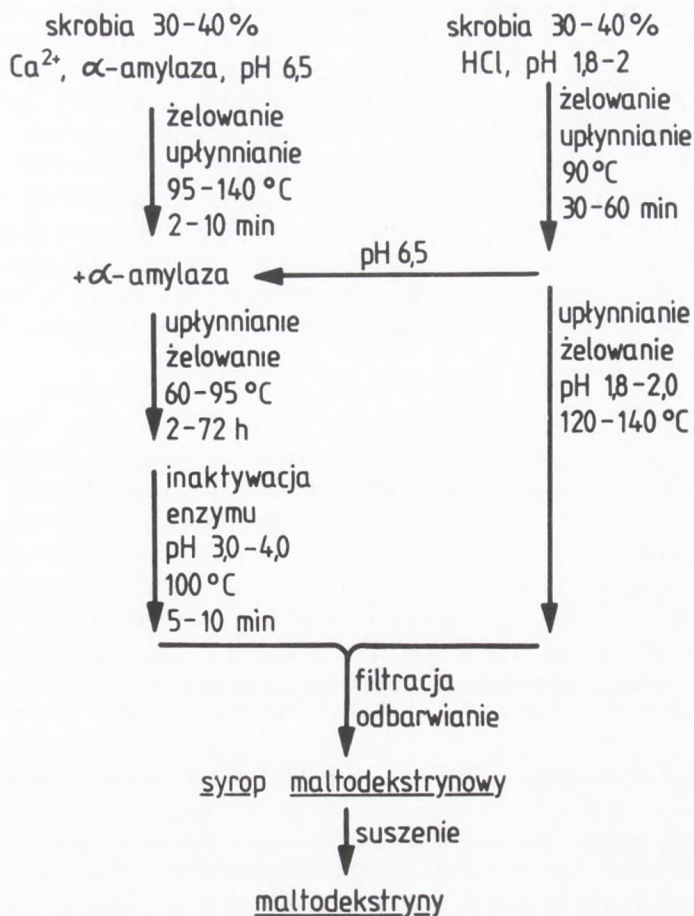
Duże zainteresowanie produktami hydrolizy skrobi spowodowało, że ciągle poszerzane są badania nad budową i otrzymywaniem skrobi różnego pochodzenia, poszukiwaniem nowych źródeł enzymów i modyfikacją już znanych biokatalizatorów oraz nad mechanizmem ich działania. Równolegle prowadzone są prace dotyczące otrzymywania nowych produktów i badania nad doбором warunków procesowych, pozwalających na maksymalne wykorzystanie substratów i biokatalizatorów. Ważna jest także część dotycząca matematycznego opisu procesów, co umożliwi stworzenie właściwej konfiguracji reaktorów w wielostopniowych procesach degradacji skrobi. Obok głównych nurtów, znaczący wpływ na całość procesową od strony ekonomicznej mają również badania nad optymalizacją procesów otrzymywania i oczyszczania skrobi oraz biokatalizatorów, immobilizacją enzymów, izolacją i oczyszczaniem produktów reakcji.

2. Produkcja syropów maltodekstrynowych

Rozpatrując możliwości hydrolizy skrobi przez enzymy amylolytyczne przyjmuje się, że jest ona zbudowana z liniowej amylozy i rozgałęzionej amylopektyny. Uproszczenie to w realnych procesach nie jest wystarczające, gdyż budowa skrobi jest bardziej skomplikowana. Wyróżnia się partię skrobi łatwo rozpuszczalną w wodzie i trudno rozpuszczalną [5], frakcję liniową, rozgałęzioną oraz frakcję pośrednią o budowie zbliżonej do amylozy, ale nie dającej niebieskiego zabarwienia z jodem [6]. Spośród wymienionych frakcji, amyloza jest najbardziej podatna na hydrolizę enzymatyczną [7,8]. W skrobi występuje faza amorficzna, słabo hydrolizowana przez α -amylazy upłynniające [9] oraz polimorficzne struktury krystaliczne, zbudowane z upakowanych podwójnych helis amylozy i amylopektyny [9]. Wyróżnia się struktury jednoskośne (A), heksagonalne (B) i mieszane (C), przy czym krystality A wymagają przeciętnie temperatury wyższej o 20°C niż B aby nastąpiło ich żelowanie [10] oraz łatwiej poddają się amylolyzie [8].

Podczas procesu enzymatycznego upłynniania amylozy w skrobi oraz, w większym stopniu, podczas hydrolizy kwasowej, dochodzi do łączenia oligosacharydów o DP 2-10 w liniowe formy polimeryczne (lintneryzacja), a także tworzenia frakcji amorficznej i, przy odpowiednio długich czasach reakcji, do formowania krystalitów B (retrogradacja) [8,11]. W przeciwieństwie do zretrogradowanej amylozy, zretrogradowana amylopektyna stosunkowo łatwo ulega amylolyzie [11].

Konsekwencją występowania frakcji skrobi trudno hydrolizowanej jest konieczność stosowania długich czasów reakcji i brak możliwości jej całkowitej depolimeryzacji. Dlatego po każdym procesie następuje odfiltrowanie fazy nierozpuszczalnej w wodzie. Natomiast konsekwencją warstwowej budowy ziarn skrobi, w których warstwy zewnętrzne zawierają więcej amylozy i łańcuchów pośrednich oraz łatwiej ulegają żelifikacji [6], jest konieczność stosowania dwustopniowego upłynniania. Enzymatyczne upłynnianie skrobi prowadzi się, dodając do zawiesiny natywnej skrobi α -amylazę oraz jony Ca^{2+}



Rys. 1. Otrzymywanie syropów maltodekstrynowych.

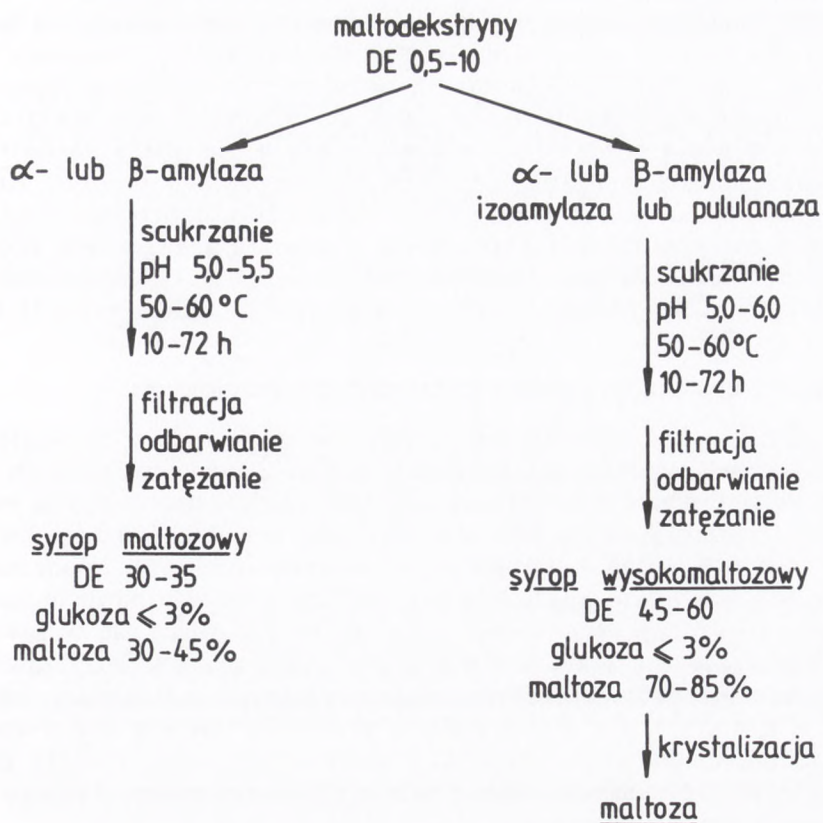
(stabilizator trwałości i aktywator enzymu [12]), po czym następuje żelifikacja z częściowym upłynnianiem w temperaturze 95-140°C, przez 3-10 minut (rys. 1 [1-4,13]). W tak wysokiej temperaturze enzym zachowuje aktywność tylko przez kilka minut, jednak w tym czasie znacząco obniża lepkość częściowo żelowanej skrobi (1). Właściwy proces upłynniania jest prowadzony w reaktorze okresowym, w temperaturze 60-90°C w czasie od kilku godzin do kilku dni, z nową porcją enzymu, którym — w zależności od potrzeb — może być α -amylaza upłynniająca lub scukrzająca. Ponieważ większość skrobi posiada temperaturę żelifikacji $\geq 60^\circ\text{C}$ [14], warunki te zapewniają jej systematyczną żelifikację, a w obecności enzymu nie dochodzi do drastycznych zmian lepkości mieszaniny reakcyjnej. Jednocześnie hydroliza enzymatyczna przejściowych produktów do niskocząsteczkowych oligosacharydów znacznie obniża możliwość zajścia retrogradacji.

Proces hydrolizy kwasowej jest również dwustopniowy, przy czym wstępny etap przebiega w temperaturze niższej. Wynika to z faktu, że szybka hydroliza amylozy do oligomerów wywołuje lintneryzację, która, wraz z obniżaniem temperatury, powoduje tworzenie włókien polisacharydowych, odpornych na hydrolizę kwasową. Dlatego dalsze upłynnianie skrobi prowadzi się w temperaturze wyższej. W metodzie mieszanej etap pierwszy przebiega analogicznie, jak w kwasowej, a etap drugi, po uprzednim zalkalizowaniu roztworu, jak w hydrolizie enzymatycznej. We wszystkich przypadkach stopień hydrolizy skrobi jest kontrolowany czasem trwania reakcji, a w przypadku stosowania enzymów, również ich stężeniem. Produkty końcowe, o różnych wartościach DE, są następnie filtrowane i odbarwiane w kolumnach wypełnionych węglem aktywnym.

W związku z tym, że syropy maltodekstrynowe są niestabilne w niższych temperaturach, po zakończeniu hydrolizy doprowadza się je do formy sproszkowanej, po uprzednim zateżeniu i wysuszeniu. Cechy charakterystyczne maltodekstryn to tworzenie roztworów o wysokiej lepkości, bardzo niska słodkość i higroskopijność oraz zdolność do ograniczania wzrostu kryształów lodu. Ze względu na swoje właściwości są stosowane w produkcji lodów i mrożonek, miękkich cukierków, polew do ciast bądź też tworzenia zewnętrznych warstw cukierków i leków w formie pastylek [1,15]. Używane są także w procesach wiązania i otoczkowania (enkapsulacji) związków zapachowych oraz leków, chroniąc je przed utlenianiem i przedłużając trwałość [1]. Ze względu na możliwość tworzenia razem z białkami, surfaktantami i niewielką ilością tłuszczu produktów o konsystencji kremów, maltodekstryny traktuje się jako związki częściowo zastępujące tłuszcze w żywności niskotłuszczowej [16] oraz częściowe substytuty albuminy w wyrobach cukierniczych [1], regulatory wilgotności chleba o przedłużonej trwałości, dodatek do hydrolizatów białkowych czy też jako wypełniacze w sproszkowanej żywności i w preparatach leczniczych. Ostatnie trzy zastosowania wymagają oddzielenia od maltodekstryn oligosacharydów o $DP < 5$ [15]. Stosowany jest zatem nieco zmodyfikowany proces, w którym etap upłynniania prowadzi się do wartości $DE = 20$, inaktywuje enzym, filtruje, a następnie prowadzi filtrację żelową, celem oddzielenia oligosacharydów. Po wysuszeniu, produkt końcowy nosi nazwę wysokocząsteczkowej maltodekstryny. Najczęściej jednak syropy maltodekstrynowe są poddawane dalszym etapom degradacji, prowadzącym do otrzymywania syropów skrobiowych.

3. Produkcja syropów skrobiowych

Materiałem wyjściowym do produkcji syropów skrobiowych są syropy maltodekstrynowe o różnych wartościach DE. Tak też syropy maltozowe i maltooligosacharydowe otrzymuje się z upłynnionej skrobi o $DE 0,5 - 10$, cyklodekstryny o $DE 2-3$, syropy izomaltooligosacharydowe o $DE 2-3$ lub $40-50$, syropy glukozowe o $DE 5-15$ i syropy o wysokiej zawartości cukrów fermentujących o $DE 38-40$ [1-4,15].



Rys. 2. Otrzymywanie syropów maltozowych.

3.1. Syropy maltozowe

Wyróżnia się dwa typy syropów maltozowych, różniące się zawartością maltozy (rys. 2, [1,13,15,17]). Typowe syropy maltozowe, zawierające 30-45% maltozy w produkcie końcowym, otrzymuje się w procesie scukrzania syropu maltodekstrynowego do DE 30-35 z udziałem β -amylazy lub maltogenicznej α -amylazy. Relatywnie wysoka temperatura procesu (50-60°C) pozwala nie tylko zwiększyć szybkość reakcji, ale także ograniczyć wzrost mikroorganizmów w procesach okresowych, trwających od kilku do kilkudziesięciu godzin. Zalecana jest niska wartość pH mieszaniny reakcyjnej, korzystna dla procesu prowadzonego z udziałem β -amylazy oraz ze względu na wyższą stabilność glukozy i maltozy w pH 4-5 [3]. Tak otrzymany syrop, po filtracji i odbarwieniu, posiada niską lepkość i higroskopijność, średnią słodkość i jest stabilny w podwyższonych temperaturach. Stosowany jest jako związek regulujący wilgotność żywności, stabilizator i nośnik związków zapachowych, w produkcji słodocy, napojów bezalkoholowych, ciast, mrożonych przetworów cukierniczych oraz żywności dla dzieci i diabetyków.

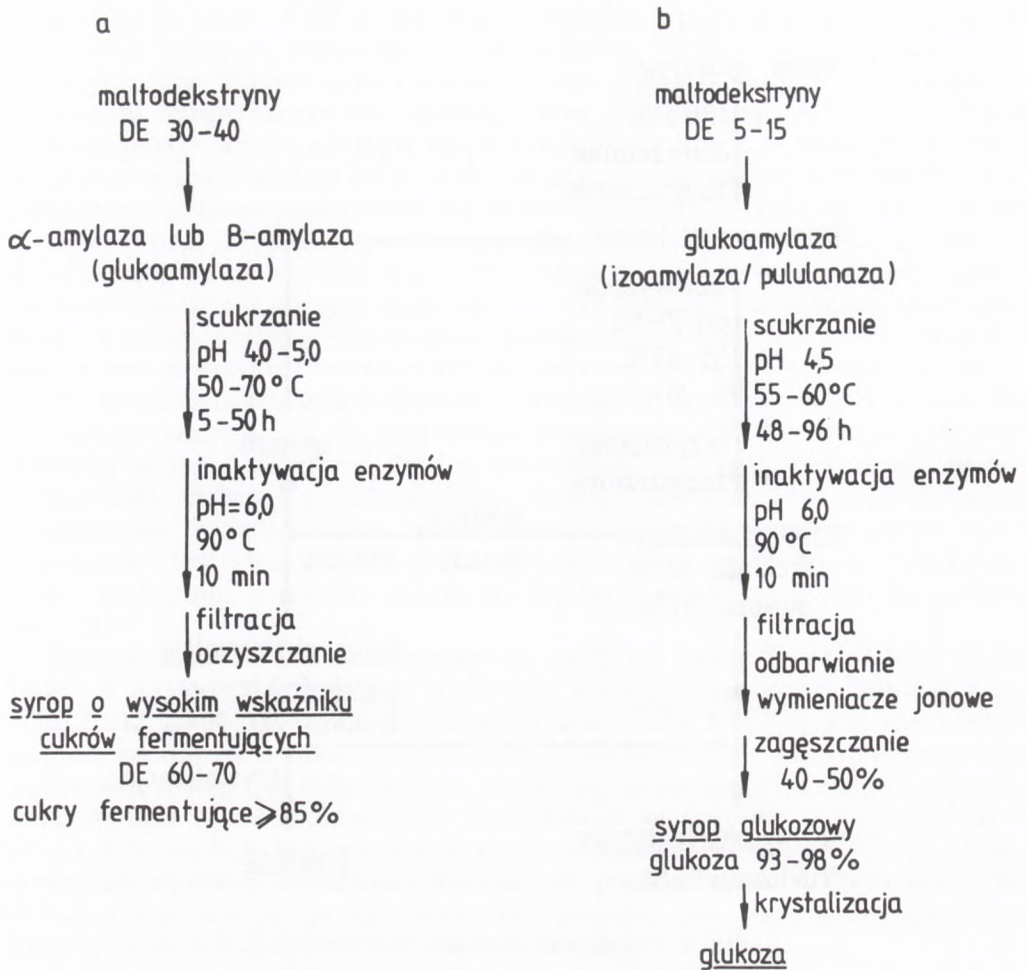
Produkcja syropów maltozowych o wyższej niż 45% zawartości maltzy wymaga jednoczesnego stosowania enzymu hydrolizującego wiązania α -1,6-glikozydowe (izoamylaza czy pululanaza) oraz enzymu scukrzającego, co pozwala na prawie całkowitą hydrolizę amylozy, natomiast amylopektyna jest hydrolizowana w 85% [5]. Po zakończeniu reakcji, produkty są filtrowane, odbarwiane i zateżane, po czym prowadzi się krystalizację maltozy. Krystaliczna maltoza jest stosowana we wlewach dożylnych u diabetyków, zastępując glukozę, natomiast zateżone syropy wysokomaltozowe stosuje się w produkcji maltitolu (alkohol wielohydroksylowy) i maltulozy (4- α -D-glukopiranozylo-D-fruktoza), które są słodzikami o bardzo niskiej wartości kalorycznej [1,18,19].

3.2. Syropy o wysokiej zawartości cukrów fermentujących

Syropy te czasami zaliczane są do syropów maltozowych, ze względu na wysoką zawartość maltozy [1]. Produkowane są z udziałem różnych typów enzymów amylolytycznych (α -amylazy, β -amylazy, glukoamylazy) i są jednymi z nielicznych, w których etap upłynniania można prowadzić metodą kwasową lub mieszaną [1]. Skład enzymów w mieszaninie reakcyjnej podczas scukrzania zależy od żadanego udziału glukozy i maltozy w produkcie finalnym (rys. 3a, [1,15,17,20]). Najczęściej udział glukozy zawiera się w granicach 30-40%, natomiast maltozy stanowi 30-50%. Syropy o wyższej zawartości glukozy (35-43%) wymagają użycia glukoamylazy oraz β -amylazy lub maltogenicznej α -amylazy. Syropy o wyższej zawartości maltozy korzystnie jest otrzymywać w obecności α -amylazy i β -amylazy. Produkty reakcji, głównie w formie ciekłej, znajdują zastosowanie w gorzelnictwie, browarnictwie i w przemyśle piekarniczym.

3.3. Syropy glukozone

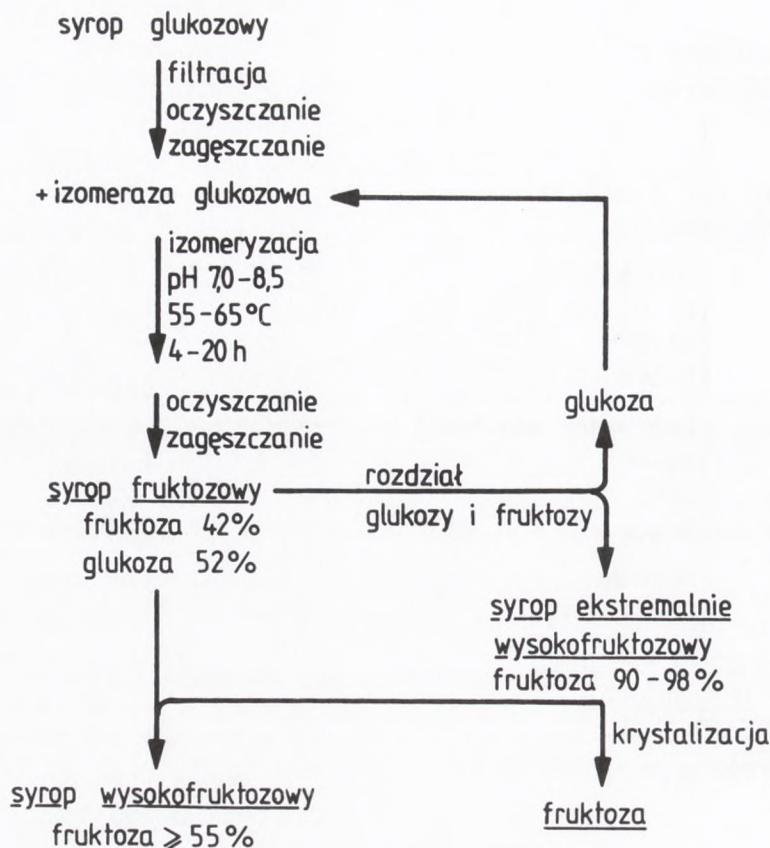
Syropy glukozone produkuje się głównie z maltodekstryn o DE 5-15, przy czym stosowanie substratu o DE 5-7 ogranicza powstawanie maltulozy, jako produktu ubocznego [21]. Proces scukrzania skrobi prowadzi się najczęściej w obecności termostabilnej glukoamylazy w reaktorze okresowym przez 2-4 dni, do momentu osiągnięcia maksymalnej zawartości glukozy (rys. 3b, [1-4,15,22]). Jakkolwiek równowaga reakcji ustala się przy stężeniu 87% glukozy w suchej masie produktów, to jak długo liczba wiązań α -1,4-glikozydowych przeważa liczbę wiązań α -1,6, stężenie glukozy może przewyższać wartość charakterystyczną dla stanu równowagi reakcji i osiągać nawet 93% [3]. Dłuższe czasy reakcji powodują, że w obecności wysokich stężeń glukozy ma miejsce reakcja kondensacji, a stężenie glukozy ustala się na poziomie 87%. W związku z tym, że glukoamylaza hydrolizuje wiązania α -1,6-glikozydowe, usytuowane od strony nieredukującej oligosacharydów [23], oraz jej działanie jest blokowane obecnością ufosforylowanych reszt glukozy [6], maksymalny poziom glukozy w syropie nie przekracza, jak wspomniano, 93% suchej masy. Stopień hydrolizy skrobi można podwyższyć, stosując jednocześnie izoamylazę lub pululanazę [1,3,5,13,15,24]. Zastosowanie enzymów znoszących



Rys. 3. Otrzymywanie syropów o wysokiej zawartości cukrów fermentujących (a) i syropów glukozowych (b).

rozgałęzienia skraca znacznie czas trwania procesu oraz pozwala podwyższyć zawartość glukozy w syropie do 96% (izoamylaza [24]), a nawet 98% (pululanaza [3]), przy czym moment dodania enzymów oraz kontrola stężenia glukozy w mieszaninie reakcyjnej mają decydujące znaczenie ze względu na możliwość wystąpienia szybkiej reakcji kondensacji w wysokich stężeniach glukozy.

Typowy skład syropu glukozowego to: 93-98% glukozy, 1-3% maltozy, 0,3-0,5% maltotriozy oraz od 1 do 2% wyższych sacharydów [25]. Syropy te są stosowane w procesach fermentacyjnych (produkcja leków, witamin, kwasów organicznych), w przemyśle cukierniczym i do produkcji żywności dla niemowląt [1-4, 15, 17, 25]. Przede wszystkim jednak syropy glukozowe są używane jako substrat w otrzymywaniu syropów fruktozowych.



Rys. 4. Otrzymywanie syropów fruktozowych.

Z syropów glukozowych otrzymuje się również trzy krystaliczne formy D-glukozy: α -D-glukopiranozę jednowodną, bezwodną α -D-glukopiranozę oraz bezwodną β -D-glukopiranozę [3], przy czym największe znaczenie posiada produkcja glukozy uwodnionej. Stosuje się ją we wlewach dożylnych i w diecie płynnej w leczeniu oraz w produkcji polidekstrozy. Polidekstroza, nie posiadająca słodkiego smaku i o bardzo niskiej wartości kalorycznej (1 cal/g) jest używana w produkcji żywności niskokalorycznej [18]. Z glukozy otrzymuje się również sorbitol, który podczas jedzenia wywołuje uczucie schładzania [1].

3.4. Syropy fruktozowe

W produkcji syropów fruktozowych stosuje się syropy glukozowe o wysokim stopniu oczyszczenia, gdyż izomeraza glukozowa ulega szybkiej inaktywacji w obecności cukrowców nie będących glukozą oraz różnych jonów,

a szczególnie jonów Ca^{2+} w stężeniach powyżej 2 ppm [1-3,15,22,26]. Syrop glukozowy wstępnie zagęszcza się do stężenia 40-45%, dodaje jonów magnezowych jako aktywatorów i stabilizatorów enzymu, po czym prowadzi się reakcję w temperaturze od 55-65°C przez 4-20 h (rys. 4, [1-3,22]). Czas trwania reakcji zależy od typu zastosowanego reaktora; w reaktorze okresowym proces trwa średnio 20 h, podczas gdy w reaktorze przepływowym z immobilizowaną izomerazą glukozową średni czas przebywania substratu w reaktorze wynosi 4 h [22]. Wysoka temperatura reakcji pozwala skrócić proces, a także wpływa na wartość stałej równowagi reakcji, która ze wzrostem temperatury rośnie na korzyść fruktozy [22]. Wartość pH mieszaniny reakcyjnej również zależy od typu stosowanego reaktora. W reaktorach okresowych zalecane jest stosowanie wartości pH bliskich odczynowi obojętnemu ze względu na długi czas trwania reakcji oraz wartość pH_{opt} i zakres pH-stabilności natywnego enzymu [2]. W reaktorach przepływowych preferowane jest środowisko bardziej zasadowe. Produktem reakcji jest syrop fruktozowy, zawierający 42% fruktozy i 52% glukozy, którego słodkość jest porównywalna z sacharozą. Ponadto obniża on punkt zamarzania i podwyższa punkt wrzenia cieczy i jest stosowany w piekarnictwie oraz w produkcji mrożonej żywności, zastępując częściowo sacharozę lub/ oraz obniżając wzrost kryształów lodu [1].

Syropy wysokofruktozowe otrzymuje się przez rozdzielenie glukozy i fruktozy, a następnie zmieszanie roztworów wysokooczyszczonej fruktozy i syropu fruktozowego. Mieszanina, zawierająca $\geq 55\%$ fruktozy jest nieco słodsza od sacharozy i obecnie powszechnie stosowana w produkcji napojów i żywności, zastępując całkowicie lub częściowo sacharozę [1]. Ponieważ w obecności syropu wysokofruktozowego krystalizacja sacharozy jest znacznie ograniczona, stosowany jest w przetwórstwie owocowym. Natomiast syropy o ekstremalnie wysokiej zawartości fruktozy są produkowane w niewielkich ilościach i używane do przygotowywania żywności dla diabetyków, gdyż fruktoza jest metabolizowana bez udziału insuliny [1,2,18].

3.5. Otrzymywanie cyklodekstryn

Cyklomaltooligosacharydy, zwane cyklodekstrynami (CD), to związki zawierające 6, 7, lub 8 reszt glukozowych (odpowiednio α -, β - i γ -CD). Posiadają one ściśle określony wymiar wewnętrzny — kolejno: 0,57; 0,78 i 0,95 nm — w którym woda może być łatwo zastąpiona mniej polarnymi substancjami [1]. Tworzenie związków klatratowych (związki włączeniowe), zwane również molekularną enkapsulacją lub kompleksowaniem, zwykle powoduje utratę rozpuszczalności i wytrącanie kompleksów w formie krystalicznej. Zdolność do włączania kompleksantów jest uzależniona od charakteru i rozmiaru cząsteczki kompleksanta oraz typu cyklodekstryny. Związki tworzące klatraty z cyklodekstrynami to: węglowodory oraz alkohole alifatyczne i polihydroksylowe, alifatyczne estry, etery i ketony o 2-4 atomach węgla, związki aromatyczne, cykliczne ketozy czy tetra- lub pentaterpenoidy [1,27-29]. W przemyśle spożywczym i farmaceutycznym cyklodekstryny są stosowane między

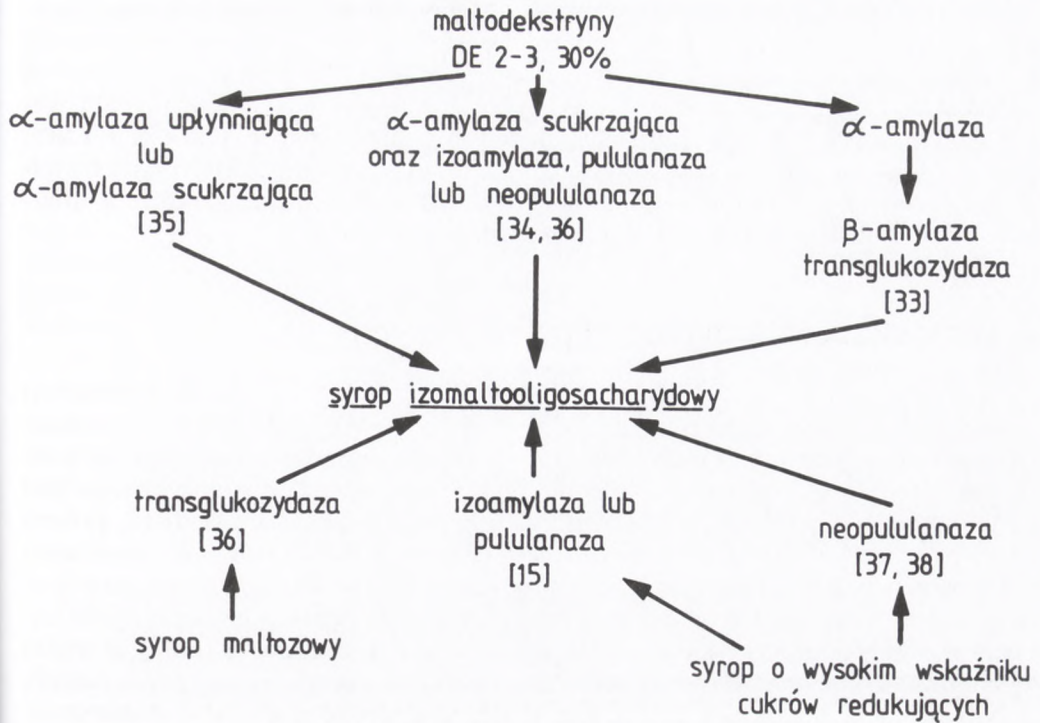
innymi w procesach wiązania i usuwania kofeiny z roztworów oraz związków nadających gorzki posmak sokom cytrusowym, do stabilizacji związków zapachowych i przypraw w żywności, do wiązania witaminy D₂ oraz do stabilizacji emulsji tłuszczowych [1,15,29]. Sugeruje się również możliwość użycia α - i γ -CD do zwiększania rozpuszczalności związków organicznych w kompleksach z CD oraz obniżania stężeń substratów i produktów w mieszaninach reakcyjnych. Wysoki koszt otrzymywania cyklodekstryn limituje jednak wiele ich zastosowań [1].

Cyklodekstryny można otrzymywać ze skrobi o DE 2-5 z udziałem glikozylotransferaz cyklodekstryn (α -, β -, γ -CGTazy) [30]. W typowych warunkach procesowych (10% roztwór upłynnionej skrobi, 40-60°C) preferowana jest produkcja niecyklicznych oligosacharydów, natomiast produkcja CD jest ograniczona obecnością glukozy i maltozy oraz niską wartością stałej równowagi reakcji [30]. Ze względu na długi czas trwania reakcji (72 h), szczególnie istotne znaczenie ma sterylność procesu. Pod koniec reakcji, do mieszaniny dodaje się α -amylazę i glikoamylazę, celem zhydrolizowania pozostałych maltooligosacharydów, a następnie całość odwadnia [1,15]. W trakcie odwadniania najszybciej krystalizuje β -CD, następnie α -CD i na końcu γ -CD.

Znacznie większe wydajności osiąga się, prowadząc reakcję w obecności kompleksantów. Proces jest wówczas ukierunkowany na otrzymywanie jednego typu CD poprzez odpowiedni dobór związku kompleksującego. Na przykład α -CD tworzy nierozpuszczalne klatraty z 1-dekanolem, β -CD z cyklooktanem, a γ -CD z cyklotridekanonem [1,30]. Zaletami stosowania organicznego kompleksanta jest brak konieczności prowadzenia procesu w warunkach aseptycznych, łatwa izolacja cyklodekstryny z mieszaniny reakcyjnej, ponadto, przy odpowiednio długich czasach reakcji, wydajność procesu osiąga 35-50%.

Ponieważ tworzenie CD przebiega na drodze enzymatycznego dysproporcjonowania i cyklizacji, można je również otrzymywać z maltozy (β -CD), maltotriozy lub maltoheksaozy (β lub α -CD) [30]. Reakcje te znacząco zależą od temperatury reakcji i zachodzą jedynie w zakresie od 5 do 25°C i w obecności ściśle określonych kompleksantów.

Rozpatruje się również możliwość produkcji rozgałęzionych cyklodekstryn (glukozo-CD = G₁-CD i maltozo-CD = G₂-CD), które są łatwiej rozpuszczalne w wodzie od związków wyjściowych i mogą tworzyć rozpuszczalne związki klatratowe [31]. Stosując pululanazę, maltozę i odpowiednią CD jako reagenty, można otrzymać w reakcji kondensacji G₂-CD oraz (G₂)₂-CD. Niską wydajność reakcji, spowodowaną zarówno inhibicją enzymu przez cyklodekstryny [32], jak i wartością stałej równowagi reakcji, można znacznie zwiększyć, stosując jednocześnie glikoamylazę [31]. Enzym ten, odcinając resztę glukozową maltozy połączonej wiązaniem α -1,6-glikozydowym z CD, powoduje usuwanie produktu reakcji i powstawanie szeregu rozgałęzionych cyklodekstryn: G₁-CD, (G₁)₂-CD, (G₁,G₂)-CD oraz G₂-CD z wydajnością do 70%.



Rys. 5. Otrzymywanie izomaltooligosacharydów.

3.6. Syropy maltooligosacharydowe i izomaltooligosacharydowe

Syropy maltooligosacharydowe początkowo otrzymywano przez chromatograficzną izolację oligosacharydów o DP 3-6 z mieszaniny otrzymanej po scukrzeniu skrobi [15]. Obecnie produkowane są z upłynnionej skrobi o DE 3-5, następują hydrolizę izoamylazą lub pululanazą i po inaktywacji enzymu, pojedynczym enzymem lub mieszaniną enzymów należących do egzo- α -amylaz [1,15,33]. Egzo- α -amylazy, uwalniając od nieredukującego zakończenia skrobi liniowe oligosacharydy zawierające 3,4,5 lub 6 reszt glukozydowych, umożliwiają produkcję syropów charakteryzujących się delikatnie słodkim smakiem (30% słodkości sacharozy), niską lepkością oraz niską podatnością na retrogradację. Stosowane są w produkcji żywności sproszkowanej i niskokalorycznej jako substytuty sacharozy, a także w ciekłej diecie dla chorych.

Podobne właściwości posiadają syropy izomaltooligosacharydowe, które noszą nazwę „Alo mikstura”. Bardzo niska podatność izomaltooligosacharydów na trawienie w przewodzie pokarmowym ludzi, zapewnia tym syropom czołowe miejsce w produkcji żywności niskokalorycznej [1,15,33]. Podkreśla się również ich korzystny wpływ na wzrost jelitowej flory bakteryjnej i ochronę przed próchnicą zębów [34]. Słodkość tego syropu jest określana na 20% słodkości sacharozy [15].

Do produkcji syropów o podwyższonej zawartości izomaltooligosacharydów można stosować wstępnie upłynnioną skrobię lub syropy maltozowe czy o wysokim wskaźniku cukrów fermentujących (rys. 5). Biokatalizatorami są najczęściej różne kombinacje α -amylaz upłynniających i scukrzających, enzymów znoszących rozgałęzienia, β -amylazy i transglikozydazy (EC 3.2.1.20), przy czym najważniejsza rola przypada enzymom o wysokiej aktywności transglikozydazowej, takim jak: transglikozydaza, neopululanaza, niektóre α -amylazy scukrzające, enzymy znoszące rozgałęzienia.

4. Immobilizacja enzymów amylolitycznych

Hydroliza skrobi na dowolnym jej etapie może być prowadzona z udziałem mikroorganizmów produkujących odpowiednie enzymy, ekstraktów enzymatycznych, oczyszczonych enzymów oraz enzymów unieruchomionych na nośnikach nierozpuszczalnych w wodzie. Wybór preparatu enzymatycznego jest podyktowany warunkami procesowymi, takimi jak: pH, temperatura, proces okresowy bądź ciągły i żądany stopień czystości produktów. W procesach okresowych i przy niskiej dopuszczalnej czystości produktów korzystne jest stosowanie mikroorganizmów, ekstraktów bądź wstępnie oczyszczonych enzymów. Zaletą takich metod upłynniania czy scukrzania skrobi jest niski koszt białek enzymatycznych, natomiast wadami długie czasy przebywania substratu w reaktorze, a co za tym idzie, możliwość wzrostu mikroorganizmów w mieszaninie reakcyjnej. Zapobiega się temu, stosując temperatury wyższe niż 50°C , co narzuca konieczność stosowania enzymów o wysokiej stabilności w warunkach procesowych. Z kolei enzymy o podwyższonej termostabilności, często modyfikowane metodami inżynierii genetycznej, są znacznie droższe, a ich stosowanie zawężone ograniczeniami patentowymi.

Przy relatywnie wysokich cenach enzymów może się okazać opłacalna ich immobilizacja, która w praktyce przemysłowej sprowadza się głównie do związania z nierozpuszczalnymi w wodzie nośnikami lub zamknięciem w sieci żelu. Preparaty immobilizowane pozwalają na wielokrotne użycie enzymu w procesach okresowych lub na prowadzenie procesów ciągłych. Te z kolei umożliwiają znaczne skrócenie czasów przebywania substratu w reaktorze, a zatem obniżają wymogi odnośnie do wysokich temperatur. Kolejnym wskazaniem do immobilizowania enzymów jest możliwość znacznego zwiększenia termostabilności białek po ich związaniu z nośnikiem, co pozwala na podwyższenie temperatury procesu, zwiększającej szybkość reakcji i skracającej jednocześnie czas jej trwania lub/oraz podwyższającej stopień przereagowania substratu.

Wszystkie omawiane enzymy były stabilizowane za pomocą pełnej gamy procedur immobilizacyjnych (adsorpcja, wiązanie jonowe i kowalencyjne, kopolimeryzacja, sieciowanie, zamykanie w sieci żelu, z wykorzystaniem membran ultrafiltracyjnych i innych) oraz nośników (polimery syntetyczne, naturalne, nośniki nieorganiczne), a ich pełny przegląd można znaleźć w obszernych opracowaniach [1-4,14,15,17,25] i w literaturze szczegółowej [22,40-56].

W cytowanej literaturze dominuje pogląd, że najmniej opłacalne jest wiązanie α -amylaz oraz enzymów znoszących rozgałęzienia, co ma bezpośredni związek z miejscem cięcia substratu i jego dostępnością w unieruchomionym enzymie. Zatem, jedynym uzasadnieniem stosowania drogiej i czasochłonnej procedury immobilizacji może być istotne zwiększenie termostabilności biokatalizatora, co w niewielu przypadkach jest dobrze udokumentowane.

O wiele częściej stosuje się immobilizację β -amylaz i glikoamylaz, należących do egzoenzymów. Obok umożliwienia prowadzenia procesów ciągłych, podkreśla się wzrost termostabilności, a także, rzadziej, podwyższenie wartości pH_{opt} związanych enzymów, co pozwala uniknąć kłopotliwej zmiany wartości pH mieszaniny reakcyjnej po procesie upłynnienia.

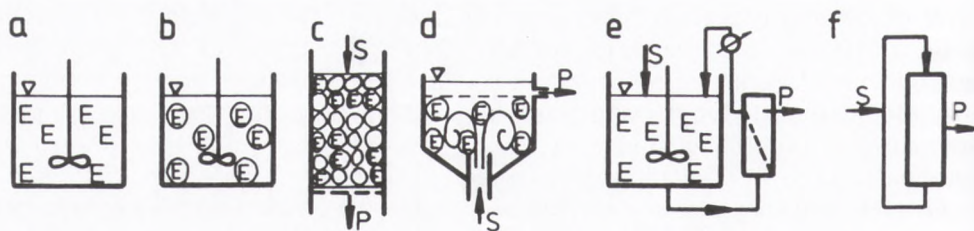
Izomeraza glukozowa jest enzymem powszechnie stosowanym w formie immobilizowanej. W tym przypadku istotna jest głównie termostabilność preparatu. Proces izomeryzacji prowadzony jest w temperaturze $60^{\circ}C$ nie tylko ze względu na ograniczenie możliwości wzrostu mikroorganizmów, ale również ze względu na wartość stałej równowagi reakcji (K). W związku z tym, że jest to reakcja endotermiczna wraz ze wzrostem temperatury rośnie stosunek stężeń fruktozy do glukozy, osiągając wartość $K = 1,1-1,12$ w $60^{\circ}C$, podczas gdy w temperaturze $30^{\circ}C$ wynosi ona $0,87-0,89$ [2,3,15,25].

Kolejnym uzasadnieniem immobilizowania enzymów może być umożliwienie łączenia procesów sukcesywnych w procesy jednoczesne. Tak też w systemach dwuenzymatycznych α -amylaza może być łączona z glikoamylazą [57-61] bądź β -amylazą [57], α -amylaza z pululanazą/izomylazą [62,63], pululanaza/izomylaza z glikoamylazą [2,57] lub β -amylazą [1,64,65] czy glikoamylaza z izomerazą glukozową [2,66,67]. Istnieją też możliwości stosowania systemów trójenzymatycznych jak: α -amylaza, glikoamylaza i izomeraza glukozowa [2] czy pululanaza, glikoamylaza i izomeraza glukozowa [68]. Największe ograniczenia w stosowaniu systemów dwu- i trójenzymatycznych narzuca zazwyczaj duża rozbieżność w wartościach pH_{opt} poszczególnych enzymów.

Podstawą zasadności stosowania systemów dwu- i trójenzymatycznych jest znaczne skrócenie całkowitego czasu procesów (zazwyczaj stosuje się hydrolizę następczą) oraz lepsze wykorzystanie substratu, czyli tak zwana głębsza hydroliza. Dodatkowo, w większości badanych przypadków, wykazano istnienie synergizmu działania enzymów. Najlepiej udokumentowany jest synergizm α -amylazy i glikoamylazy [58-60], w którym α -amylaza, hydrolizując wiązania wewnątrz cząsteczki skrobi, produkuje kolejne nieredukujące zakończenia łańcuchów skrobi, od których glikoamylaza odszczepia reszty glukozowe. Z kolei glikoamylaza, hydrolizując wiązania α -1,4-glikozydowe w sterzających na zewnątrz łańcuchach skrobi, udostępnia wewnątrz cząsteczki substratu dla α -amylazy.

5. Reaktory w procesach hydrolizy skrobi

Reaktory stosowane w procesach enzymatycznych można podzielić na przepływowe i okresowe oraz reaktory z enzymem natywnym i immobilizowanym.

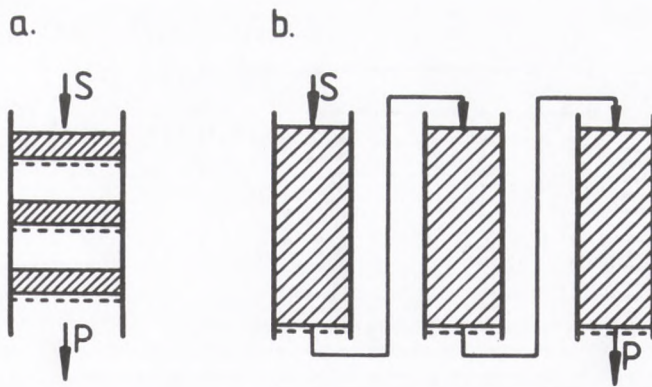


Rys. 6. Reaktory okresowe (a i b) oraz przepływowe (c-f), stosowane w procesach enzymatycznej hydrolizy skrobi: (a) — reaktor mieszalnikowy z enzymem natywnym; (b) — reaktor mieszalnikowy z enzymem immobilizowanym; (c) — reaktor kolumnowy ze złożem upakowanym; (d) — reaktor fluidyzacyjny; (e) — reaktor membranowy z enzymem natywnym; (f) — reaktor recykulacyjny membranowy lub ze złożem upakowanym; (S) — substrat; (P) — produkt; (E) — enzym.

O wyborze danego typu reaktora decydują takie czynniki, jak: forma enzymu (natywny, immobilizowany), masa cząsteczkowa substratu, stabilność enzymu, substratu i produktów reakcji w warunkach procesowych, występowanie inhibicji substratem lub/oraz inhibicji produktami reakcji, zmiana wartości pH mieszaniny reakcyjnej, tworzenie produktów ubocznych, rozpuszczalność reagentów, wymogi odnośnie do sterylności procesu i żądany stopień prze-reagowania substratu.

Typy reaktorów, najczęściej używanych w procesach hydrolizy skrobi, przedstawiono na rysunku 6. Reaktory okresowe (a i b) charakteryzują się dużą objętością, długimi czasami przebywania substratu w reaktorze oraz niską standaryzacją produktu. Skutkiem długiego czasu przebywania substratu w reaktorze jest stosunkowo wysoki poziom reakcji ubocznych [22] i konieczność stosowania kosztownej procedury oczyszczania produktów hydrolizy od związków nadających syropom brązowe zabarwienie, powstających w reakcji Millarda [1,2]. Niezbędne jest również prowadzenie procesu w wysokich temperaturach ($\geq 60^{\circ}\text{C}$) celem ograniczenia wzrostu mikroorganizmów i skrócenia czasu reakcji. Do zalet reaktorów okresowych z enzymem natywnym zalicza się: warunki zapewniające katalizę homogeniczną, dowolny dobór stężenia enzymu, możliwość stosowania substratu o wysokiej lepkości oraz stosunkowo niską cenę technicznych preparatów enzymatycznych. Natomiast w przypadku reaktorów z enzymem immobilizowanym podkreśla się wielokrotność użycia biokatalizatora, łatwość oddzielenia produktów reakcji od enzymu oraz wyższą termostabilność związanych białek enzymatycznych [1-3,15,26,49,51,52,69-71].

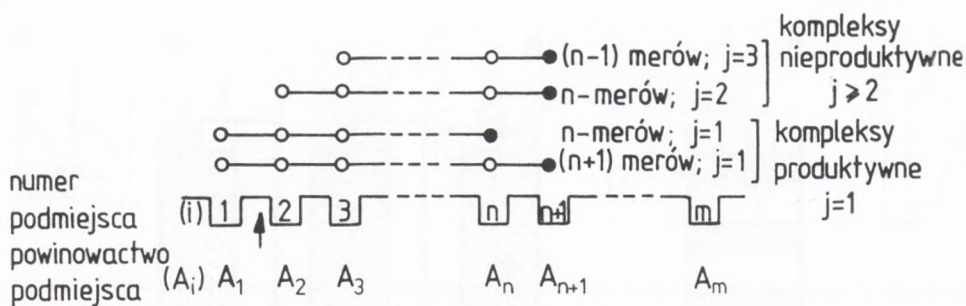
Ciekawą propozycją, pozwalającą na prowadzenie konwencjonalnego procesu w reaktorze okresowym w warunkach katalizy homogenicznej, z jednoczesną możliwością wielokrotnego użycia biokatalizatora, jest wiązanie enzymów amylolitycznych z termowrażliwymi polimerami syntetycznymi [50,72,73]. Termowrażliwy kompleks w niższych temperaturach występuje w formie rozpuszczalnej w wodzie (reakcja), a w temperaturach wyższych ulega odwracalnemu wytrąceniu (separacja).



Rys. 7. Reaktory przepływowe z immobilizowanymi enzymami: (a) — złożo warstwowe; (b) — kaskada reaktorów kolumnowych; (S) — substrat; (P) — produkt.

Największą zaletą reaktorów przepływowych (rys. 6 c-f) jest znacząco krótszy czas przebywania substratu w reaktorze, co pozwala na stosowanie wyższych stężeń substratu, niższych temperatur, ogranicza wymogi odnośnie do sterylności procesu oraz powoduje mniejszą inaktywację enzymu [1,3,15,22,71]. Reaktory fluidyzacyjne są względnie rzadko stosowane w procesach hydrolizy skrobi, gdyż wymagają bardzo precyzyjnej kontroli szybkości przepływu cieczy w reaktorze, doboru odpowiedniego nośnika, uwzględnienia wypłukiwania złoża i charakteryzują się niewielką możliwością sterowania procesu poprzez stężenie biokatalizatora [47,71,74]. Natomiast reaktor przepływowy ze złożem upakowanym jest najpowszechniej stosowanym typem reaktora z enzymem immobilizowanym w procesach otrzymywania syropów skrobiowych, a szczególnie syropów fruktozowych [1-4,15,17,22,42,46,66,71,75, 76]. Wymienia się dwa główne rozwiązania aparaturowe, mające związek z uziarnieniem immobilizowanego preparatu. W przypadku preparatu drobnoziarnistego, o wysokiej ściśliwości złoża, korzystnie jest stosować reaktor kolumnowy o nieciągłym złożu, w którym wysokość warstw nie przekracza 30 cm (rys. 7a) [2-4,77]. W przypadku nośnika o niskiej ściśliwości i dużym uziarnieniu (niskie opory przepływu cieczy w złożu) stosuje się kolumnowe reaktory ze złożem upakowanym, w których wysokość złoża wynosi od 1,5 do 4,5 m [3]. Najczęstsze konfiguracje reaktorów kolumnowych to kaskada (rys. 7b) lub szereg reaktorów równoległych, w których szybkość przepływu substratu przez złożo jest dostosowywana do aktywności danego złoża.

Zaletami przepływowych reaktorów membranowych (rys. 6e,f) są: warunki zapewniające katalizę homogeniczną, reakcja z jednoczesną separacją białek i produktów reakcji, dowolne stężenie biokatalizatora, prostota zmiany skali procesu poprzez dobranie odpowiedniej powierzchni membrany, mała objętość reaktora, mniejsza szybkość inaktywacji enzymu, produkty reakcji wolne od mikroorganizmów i pyrogenów [1,2,51,65,71,78-82]. Natomiast ich zasto-



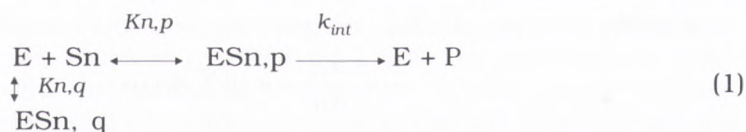
Rys. 8. Tworzenie kompleksów glukoamylaza-oligosacharyd produktywnych ($j = 1$) i nieproduktywnych ($j \geq 2$): (o) — reszta glukozowa; (•) — redukująca reszta glukozowa; (\uparrow) — miejsce położenia podmiejsca katalitycznego; (1,2...) — numer podmiejsca obszaru wiążącego substrat; (A_i) — wartość powinowactwa wiązania reszty glukozowej przez i-te podmiejsce obszaru wiążącego substrat.

sowanie w skali przemysłowej napotyka na znaczne problemy głównie ze względu na konieczność stosowania niskich stężeń substratu (lepkość), blokadę membran substratem oraz białkiem enzymatycznym (zatrucie membran i tworzenie warstwy polaryzacyjnej), inaktywację enzymu w warunkach szybkiego przepływu retentatu w module ultrafiltracyjnym (wymóg związany z ograniczeniem tworzenia warstwy polaryzacyjnej) i akumulacją trudno hydrolizowanego, wysokocząsteczkowego substratu [1,15,51,71].

6. Model matematyczny enzymatycznej hydrolizy oligosacharydów i skrobi

Obecnie zagadnienie całościowego, matematycznego opisu procesu hydrolizy skrobi należy uznać za nie rozwiązany, a liczne próby zastosowania równania Michaelisa-Menten traktować jako dyskusyjne w świetle badań dotyczących budowy obszaru katalitycznego enzymów amylolitycznych, składającego się z licznych podmiejszc (budowę obszaru katalitycznego przedstawiono w części I).

W pracach prowadzonych przez Hiromi i wsp. [83] nad glukoamylazą i oligosacharydami o stopniu polimeryzacji DP mniejszym lub równym liczbie podmiejszc obszaru wiążącego substrat ujawniono, że szybkość reakcji zależy od stopnia polimeryzacji substratu i od prawdopodobieństwa utworzenia wiązań produktywnych i nieproduktywnych. Wiadomo, że w przypadku glukoamylazy występuje tylko jeden typ ułożenia substratu w kompleks produktywny, w którym nieredukująca końcowa reszta glukozowa substratu połączy się z pierwszym miejscem obszaru wiążącego substrat ($j = 1$) (rys. 8). Zatem, dla substratu o n -merach (S_n) i kilku możliwościach utworzenia kompleksu enzym-substrat, reakcję hydrolizy można przedstawić następująco:



gdzie: Kn,p i Kn,q — stałe szybkości tworzenia, odpowiednio, kompleksów produktywnych i nieproduktywnych;

ESn,p i ESn,q — kompleksy enzym-substrat, odpowiednio, produktywne i nieproduktywne;

k_{int} — stała szybkości hydrolizy wiązania glikozydowego, niezależna od stopnia polimeryzacji substratu, będąca efektem tworzenia kompleksów produktywnych.

Stąd, stała szybkości tworzenia dowolnego kompleksu enzym-substrat (Kn,j) wynosi:

$$Kn,j = [ESn,j] / [E] [S] \quad (2)$$

gdzie: j — numer podcentrum zajmowanego przez resztę glukozową od nieredukującego końca substratu.

W warunkach stanu ustalonego reakcję (1) można opisać równaniem Michaelisa-Menten, dla którego początkowa szybkość reakcji w obecności substratu o n -merach (S_n) wynosi:

$$v = \frac{k_0[E_0][S_n]}{K_m + [S_n]} \quad (3)$$

gdzie: k_0 — pozorna stała szybkości reakcji;

K_m — pozorna stała Michaelisa.

Znaczenie pozornych (efektywnych, obserwowanych) stałych jest jednakże odmienne w porównaniu z powszechnie znanymi stałymi, gdyż ich wartość zależy od szybkości tworzenia kompleksów produktywnych i nieproduktywnych:

$$\begin{aligned}
 \frac{1}{K_m} &= \sum_j Kn, j = \sum_p Kn, p + \sum_q Kn, q \\
 k_0 &= k_{int} \left[\sum_p Kn, p / \left(\sum_p Kn, p + \sum_q Kn, q \right) \right] = \frac{k_{int}}{1 + \left(\frac{\sum_q Kn, q}{\sum_p Kn, p} \right)}
 \end{aligned}
 \quad (4) \text{ i } (5)$$

a stąd:

$$\frac{k_0}{Km} = k_{int} \left(\sum_p K_{n,p} \right) \quad (6)$$

gdzie: \sum_p , \sum_q , \sum_j — suma szybkości tworzenia kompleksów odpowiednio: produktywnych, nieproduktywnych i obu typów.

Należy zaznaczyć, że wartość k_0/Km odnosi się jedynie do wiązań produktywnych, podczas gdy wartości Km czy k_0 odnoszą się do wiązań produktywnych i nieproduktywnych.

Następnie, zakładając, że dana amylaza posiada (m) podcentrów wiążących substrat, każde o swoistej wartości powinowactwa A_i do reszty glukozowej (i — numer podcentrum wiążącego), to wartość powinowactwa (zmiana wartości energii swobodnej wiązania) B_n dla danego substratu o n -merach w danym typie wiązania (j) można opisać:

$$B_{n,j} = \left(\sum_i^{cov} A_i \right)_{n,j} = RT \ln K_{n,j} + 2,4 \text{ kcal/mol} \quad (\text{w } 25^\circ\text{C}) \quad (7)$$

gdzie: $\sum_i^{cov} A_i$ — suma powinowactw wszystkich podmiejsk centrum wiążącego związanych z substratem (S_n) w j -typie wiązania;

2,4 kcal/mol — współczynnik korekcyjny, wynikający z różnicy entropii mieszania między stanem początkowym a końcowym;

R — stała gazowa;

T — temperatura bezwzględna.

Zatem, jeżeli znane są wartości A_i każdego podcentrum, można wyznaczyć stałą $K_{n,j}$ dla dowolnego liniowego substratu w kompleksie produktywnym lub nieproduktywnym z równania:

$$K_{n,j} = 0,018 \exp \left(\sum_i^{cov} A_i \right)_{n,j} \quad (8)$$

Prawdopodobieństwo utworzenia wiązania produktywnego i nieproduktywnego dla danego substratu może być, innymi słowy przewidziane na podstawie znajomości budowy podcentrów wiążących substrat.

Liczbę podcentrów wiążących substrat wyznacza się z zależności między wartościami Km i k_0 od stopnia polimeryzacji substratu (od $DP = 2$ do $DP = 10-12$). Przyjmuje się, że liczba podcentrów wiążących odpowiada takiej wartości DP , dla której k_0/Km osiąga wartość maksymalną. Następnie, pod-

stawiając równanie (8) do (4-6), można wartości K_m i k_0 wyrazić jedną wartością rzeczywistej stałej szybkości reakcji (k_{int}) oraz (m) wartościami powinowactw (A_i) w całkowitej ($m + 1$) liczbie podcentrów. Z kolei, znając wartości (k_{int}) i (A_i) można przewidzieć ilościowe i jakościowe zmiany stężeń reagentów w miarę postępu reakcji.

Z wywodów tych wynika, że:

1) obserwowane wartości stałej K_m dla substratów o różnym stopniu polimeryzacji obniżają się ze wzrostem wartości DP, gdyż wzrasta liczba obsadzonych podcentrów oraz liczba tworzonych kompleksów produktywnych;

2) wartość k_0 jest proporcjonalna do frakcji wiązań produktywnych w sumarycznej liczbie tworzonych wiązań produktywnych i nieproduktywnych. Stąd wartość k_0 również zależy od stopnia polimeryzacji substratu. W sytuacji, gdy ilość tworzonych kompleksów produktywnych przeważa znacząco ilość nieproduktywnych, wartość $k_0 = k_{int}$ i jest DP-niezależna. Ma to miejsce, gdy wartość DP substratu (n) jest większa od liczby podcentrów wiążących substrat.

Teorię rozwiniętą przez Hiromi i wsp. [83] zastosowano i potwierdzono wielokrotnie w badaniach nad glukoamylazą [84,85], dla której należy rozpatrywać jedynie jeden typ tworzenia kompleksu produktywnego oraz dla β -amylazy [86], która wymagała uwzględnienia dwóch typów ułożenia substratu w kompleksie produktywnym. Największe problemy napotyka się w badaniach nad α -amylazami, w których należy rozpatrywać możliwości tworzenia kompleksów produktywnych i nieproduktywnych zarówno od redukującego jak i nieredukującego końca oligosacharydu [87].

W teorii budowy obszaru katalitycznego enzymów amylolitycznych dopuszcza się również, obok modelu przypadkowego cięcia substratu (A), w którym po adsorpcji substratu następuje cięcie jednego wiązania glikozydowego i w końcu desorpcja produktów (*random attack*), istnienie dwóch modeli uwzględniających szereg cięć sukcesywnych [88]. Przy odpowiednio długich łańcuchach substratu, raz utworzony kompleks produktywny umożliwia „ślizganie” się łańcucha nad centrum katalitycznym, bez konieczności kolejnych adsorpcji i desorpcji. W modelu B (*single chain attack*) desorpcja produktów występuje po całkowitej hydrolizie łańcucha lub zablokowaniu enzymu, a w modelu C (*multiple chain attack*) po maksymalnie 8 sukcesywnych cięciach.

Rozpatrując reakcję hydrolizy skrobi przez glukoamylazę z *Rhizopus niveus*, początkową szybkość uwalniania glukozy (G) w obecności substratu o n -merach (G_n) można, w zależności od założonego modelu działania enzymu na substrat, opisać równaniami bilansowymi [89]:

$$\text{model A} \quad -d[G_n]/dt = d[G]/dt$$

$$\text{i } d[G_{n-1}]/dt = d[G]/dt$$

$$\text{model B} \quad -d[G_n]/dt = (1/n) d[G]/dt$$

$$\text{i } d[G_{n-1}]/dt = 0$$

$$\text{model C} \quad -d[G_n]/dt = (1/f) d[G]/dt$$

$$\text{i } 1 < f < n$$

Z równań tych wynika, że wartość (f) określa model działania enzymu na substrat w początkowej fazie reakcji, gdyż dla modelu A $f = 1$, a dla modelu B $f = n$.

O ile w przeprowadzonych badaniach udało się stwierdzić, że dla glukoamylazy z *R. niveus* i substratu o DP 3-7 (obszar katalityczny tego enzymu składa się z 7 podmiejsc) obowiązuje model przypadkowego cięcia [89], to użycie substratu o DP = 17 wymagało zastosowania równania dla modelu C [90].

Badania nad mechanizmem i modelami działania enzymów amylolitycznych na substrat mają charakter mocno rozproszony, głównie ze względu na stosowanie różnych enzymów, substratów o niskich stopniach polimeryzacji oraz ograniczania się do początkowych stadiów reakcji. Można wyciągnąć jedynie jeden generalny wniosek, że model A obowiązuje dla reakcji z substratem o DP \leq liczbie podmiejsc w obszarze katalitycznym, natomiast nie wyklucza się działania enzymów zgodnie z modelem B lub C dla substratów o wyższym stopniu polimeryzacji. Zatem, analizując przebieg procesu hydrolizy skrobi, należy się liczyć z możliwością wystąpienia kilku faz reakcji. W fazie początkowej szybkość reakcji może być bardzo duża ze względu na obecność łatwiej hydrolizowanej amylozy [91] lub/oraz działania enzymu zgodnie z modelem B/C. Fazę końcową może natomiast charakteryzować bardzo niska szybkość reakcji, spowodowana nie tylko inhibicją produktami reakcji, ale także wzrastającymi wartościami stałych K_m i obniżającymi się wartościami k_0 wraz ze spadkiem średniego stopnia polimeryzacji substratu [83,84,86,92]. W fazie pośredniej, spadek szybkości reakcji może być związany z ubytkiem frakcji skrobi łatwiej hydrolizowanych, pojawianiem się inhibicji produktami, a zarazem substratami reakcji, a także możliwością zmiany modelu działania enzymu z B/C na A.

Problemy z matematycznym opisem procesów hydrolizy skrobi i oligosacharydów z udziałem glukoamylazy, enzymu, którego działanie na substrat traktuje się jako prostsze w porównaniu z innymi amylazami, wskazują na ich złożoność. Tak też omawiany jest wpływ stężenia substratu, produktów reakcji, lepkości czy stężenia enzymu na proces hydrolizy skrobi, ale bez prób ich matematycznego opisu [77,93]. W pracy Sanroman i in. [75] zastosowano zaledwie jedno stężenie enzymu oraz jedno stężenie substratu i opisano proces równaniem Michaelisa-Menten, przy czym konieczność wyznaczenia stałej inhibicji kompetycyjnej glukozą, jak się okazało, była zbyteczna. W innych pracach wyznaczano wartości K_m i k_0 , ale nie podjęto próby oceny ich przydatności do matematycznego opisu procesu [52,94-97]. Z kolei w przeprowadzonych badaniach nad procesem hydrolizy skrobi w reaktorze fluidyzacyjnym, pełną zgodność danych doświadczalnych i obliczonych z modelu matematycznego osiągnięto dla ujemnej wartości stałej k_0 [98]. Autorzy kolejnej pracy [99], po stwierdzeniu, że szybkość reakcji jest stała do stopnia przereagowania substratu równego 25%, a próby opisu procesu równaniem Michaelisa-Menten nie powiodły się, wykorzystali równanie empiryczne $r = 16,161C_E^{1,467} C_S^{0,193}$. Inne podejście zaprezentowali Zanin i de Moraes [69]. Zastosowali oni jako substrat oligosacharydy o DP 3-7, których część była

łatwo hydrolizowana (77%), a część — trudno, i dla obu grup wyznaczyli wartości K_m , k_0 oraz stałe inhibicji substratem i produktami reakcji. Uwzględnili również reakcję hydrolizy maltozy, maltotriozy i izomaltotriozy, inhibicję glukozą, a także reakcję kondensacji do maltotriozy. Sumaryczny wzór zawierał wartości 13 stałych, ale pełne dopasowanie danych doświadczalnych do założonego modelu matematycznego otrzymano, wprowadzając kolejną stałą, jako parametr korekcyjny.

Głównych problemów w matematycznej formalizacji procesu hydrolizy skrobi należy upatrywać:

— w braku jednorodności substratu (wiązania α -1,4- i α -1,6-glikozydowe, frakcje o różnej rozpuszczalności i podatności na hydrolizę enzymatyczną, duża rozpiętość mas cząsteczkowych);

— w wysokiej lepkości roztworów skrobi w stężeniach uzasadnionych technologicznie, a co za tym idzie, wpływie oporów dyfuzyjnych na szybkość reakcji w jej początkowej fazie [97,100] oraz zmianie lepkości mieszaniny reakcyjnej w miarę postępu reakcji [101]. Zjawisko to jest często utożsamiane z inhibicją substratem [100];

— w większej szybkości inaktywacji enzymów amylolitycznych o niskim stężeniu [102-104], a w konsekwencji obniżaniu się stopnia przereagowania substratu ze spadkiem stężenia enzymu [105];

— w zmianie wartości stałych równania kinetycznego w zależności od stopnia polimeryzacji substratu oraz w zmianie modelu działania enzymu na substrat;

— w występowaniu reakcji kondensacji i transglikozylacji w końcowej fazie procesu i w obecności wysokich stężeń produktów;

— w występowaniu inhibicji końcowymi i pośrednimi produktami reakcji.

7. Podsumowanie

Enzymatyczna hydroliza skrobi jest jednym z nielicznych procesów w przemyśle, który prawie całkowicie wyparł metody chemiczne. Łagodne warunki reakcji z udziałem enzymów amylolitycznych ograniczają tworzenie związków ubocznych, których oddzielenie od produktów końcowych stanowi główne utrudnienie w procesach kwasowej hydrolizy skrobi. Stosowanie enzymów immobilizowanych, szczególnie w produkcji syropów fruktozowych, umożliwiło wprowadzenie procesów ciągłych do przetwórstwa skrobi.

Obecnie, obok tradycyjnie stosowanego substratu — skrobi kukurydzianej — dużo uwagi poświęca się produkcji syropów ze skrobi otrzymywanej z pszenicy, ziemniaków, ryżu, *Amaranthus*, *Sorghum* czy *Manihot*. Obok syropów glukozowych i fruktozowych, wzrasta zainteresowanie specyficznymi maltodekstrynami, syropami malto- i izomaltooligosacharydowymi oraz maltozowymi. Szczególną uwagę zwraca się na te właściwości, które pozwalają wykorzystać je w produkcji żywności niskokalorycznej. Licznie istniejące i potencjalne zastosowania cyklodekstryn w przemyśle farmaceutycznym i spo-

zwykle pozwalają oczekiwać znaczącego rozwoju i optymalizacji procesów otrzymywania i izolacji tych substancji, a także produkcji odpowiednich enzymów, co powinno doprowadzić do obniżenia cen cyklodekstryn. Oczekuje się również opracowania technik takiej modyfikacji cyklodekstrynaz, które pozwoliłyby na syntezę cyklodekstryn o większej niż osiem liczbie reszt glukozy w cząsteczce.

Matematyczne modelowanie procesów enzymatycznych, pozwalające na projektowanie odpowiednich reaktorów, ich konfiguracji oraz dobór warunków procesowych, znalazło szerokie zastosowanie w produkcji syropów fruktozowych na bazie syropów glukozy. Badania nad mechanizmem działania izomerazy glukozy, wpływem stężenia reagentów, wartości pH i temperatury na szybkość i stałą równowagi reakcji oraz nad inaktywacją enzymu [57,106-109] doprowadziło do sformułowania ogólnego równania kinetycznego, umożliwiającego modelowanie i kontrolę przebiegu procesu [26,76]. W przypadku enzymów amylolytycznych, duże rozproszenie badań oraz wielość parametrów wpływających na szybkość reakcji oraz stopień przereagowania substratu, wskazuje, że zadanie to, jak się wydaje, jest ciągle dalekie od satysfakcjonującego rozwiązania.

Literatura

1. Guzman-Maldonado H., Paredes-Lopez O., (1995), *Critical Rev. Food Sci. Nutr.*, 35, 373-403.
2. Antrim R. L., Colilla W., Schnyder B. J., (1979), *Appl. Biochem. Bioeng.*, 2, 97-155.
3. Lloyd N. E., Nelson W. J., (1984), *Starch: Chemistry and technology*, Eds. Whistler R. L., Bemiller J. N., Paschall E. F., 611-660, Academic Press, Orlando-Sydney-Tokyo.
4. Reilly P. J., (1980), *Immobilized enzymes for food processing*, Ed. Pitcher Jr., W. H., CRC Press, Boca Raton, Florida, 113-151.
5. Murugesan G., Shibanuma K., Hizukuri S., (1993), *Carbohydr. Res.*, 242, 203-215.
6. Jane J., Shen, J. J., (1993), *Carbohydr. Res.*, 247, 279-290.
7. Robyt J., French D., (1963), *Arch. Biochem. Biophys.*, 100, 451-467.
8. Planchot V., Colonna P., Buleon A., (1997), *Carbohydr. Res.*, 298, 319-326.
9. Zhu Q., Bertoft E., (1996), *Carbohydr. Res.*, 288, 155-174.
10. Moates G. K., Noel T. R., Parker R., Ring S. G., (1997), *Carbohydr. Res.*, 298, 327-333.
11. Colquhoun I. J., Parker R., Ring S. G., Sun L., Tang H. R., (1995), *Carbohydr. Polym.*, 27, 255-259.
12. Brena B. M., Pazos C., Franco-Frageras L., Batista-Viera F., (1996), *J. Chromatogr. B.*, 684, 217-237.
13. Koch R., Canganella F., Hippe H., Jahnke K. D., Antranikian G., (1997), *Appl. Environ. Microbiol.*, 63, 1088-1094.
14. Kimura A., Robyt J. F., (1995), *Carbohydr. Res.*, 277, 87-107.
15. Yamamoto T., (1988), *Handbook of amylases and related enzymes*, Ed. *The Amylase Research Society of Japan*, Pergamon Press, Oxford-Sydney-Tokyo-Toronto.
16. Inglett G. E., Grisamore S. B., (1991), *Food Technol.*, 54, 104-109.
17. Okada M., Nakakuki T., (1992), *Starch hydrolysis products. Worldwide technology, production and applications*, Eds. Schenck F. W., Hebeda R. E., VCH Publ., New York, 335-366.
18. Dziezak J. D., (1988), *Food Technol.*, 43, 94-98.
19. Saha B. C., Zeikus J. G., (1987), *Process Biochem.*, 22, 78-83.
20. Saha B. C., Zeikus J. G., (1990), *Enzyme Microb. Technol.*, 12, 229-232.

21. Dias F. F., Panchal D. C., (1987), *Starch*, 39, 64-69.
22. Quax W. J., (1993), *Trends Food Sci. Technol.*, 4, 31-34.
23. Aleshin A. E., Staffer S., Firsov L. M., Svensson B., Honzatko R. B., (1996), *Biochemistry*, 35, 8319-8328.
24. Nebesny E., (1993), *Starch*, 45, 426-429.
25. Mac Allister R. V., (1980), *Immobilized enzymes for food processing*, Ed. Pitcher Jr., W. H., CRC Press Inc., Boca Raton, Florida, 81-111.
26. Prabhakar G., Raju D. C., (1995), *Bioproc. Engn.*, 12, 131-134.
27. Rendleman Jr., J. A., (1993), *Carbohydr. Res.*, 247, 223-237.
28. Lee Y., Kim H., (1991), *Enzyme Microb. Technol.*, 13, 499-503.
29. Delbourg M. F., Drouet P., de Moraes F., Thomas D., Barbotin J. N., (1993), *Biotechnol. Lett.*, 15, 157-162.
30. Rendleman Jr., J. A., (1996), *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 24, 129-137.
31. Watanabe N., Yamamoto K., Tsuzuki W., Oya T., (1997), *J. Ferment. Bioeng.*, 83, 43-47.
32. Iwamoto H., Ohno M., Ohmori M., Hirose J., Tanaka A., Sakai S., Hiromi K., (1994), *J. Biochem.*, 116, 1264-1268.
33. Kim I.-C., Yoo S.-H., Lee S.-J., Oh B.-H., Kim Y.-W., Park K.-H., (1994), *Biosci. Biotech. Biochem.*, 58, 416-418.
34. Lee S.-J., Yoo S.-H., Kim J.-W., Seok H.-M., Park K.-H., (1995), *Starch*, 47, 127-134.
35. Tonzuka T., Sakai H., Ohta T., Sakano Y., (1994), *Carbohydr. Res.*, 261, 157-162.
36. Yun J.W., Lee M.G., Song S.K., (1994), *Biotechnol. Lett.*, 16, 1145-1150.
37. Kuriki T., Yanase M., Takata H., Imanaka T., Okada S., (1993), *J. Ferment. Bioeng.*, 76, 184-190.
38. Kuriki T., Yanase M., Takata H., Takesada Y., Imanaka T., Okada S., (1993), *Appl. Environ. Microb.*, 59, 953-959.
39. Fogarty W. N., (1983), *Microbial enzymes and biotechnology*, Ed. Fogarty W. N., Applied Science Publisher, London-New York, 9-95.
40. Deshmukh S. S., Choudhury M. D., Shankar V., (1993), *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 42, 95-104.
41. Morita T., Karube I., (1995), *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 55, 75-86.
42. Arica M. Y., Hasirci V., Alaeddin N. G., (1995), *Biomaterials*, 16, 761-768.
43. de Cordt S., Hendrickx M., Maesmans G., Tobback P., (1994), *Biotechnol. Bioeng.*, 43, 107-114.
44. Ray R. R., Jana S. C., Nanda G., (1995), *J. Appl. Bacteriol.*, 79, 157-162.
45. Emneus J., Gorton L., (1993), *Anal. Chim. Acta*, 276, 303-318.
46. Toldra F., Jansen N. B., Tsao G. T., (1992), *Process Biochem.*, 27, 177-181.
47. Zanin G. M., Moraes F. F., (1995), *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 51, 253-262.
48. Manolov R. J., Kambourova M. S., Emanuilova E. I., (1993), *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 18, 409-415.
49. Liu H.-S., Chen W.-H., Lai J.-T., (1997), *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 66, 57-67.
50. Chen J.-P., Chu D.-H., Sun Y.-M., (1997), *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, 69, 421-428.
51. Gaouar O., Aymard C., Zakhia N., Rios G. M., (1997), *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, 69, 367-375.
52. Roig M. G., Slade A., Kennedy J. F., Taylor D. W., Garaita M. G., (1995), *Appl. Biochem. Biotech.*, 50, 11-33.
53. Popa I., Beldie C., (1995), *Progress Catal.*, 4, 39-46.
54. Arasaratnam V., Balasubramaniam K., (1995), *Process Biochem.*, 30, 299-303.
55. Fournier R. L., Varanasi S., Byers J. P., Chen G., (1996), *Biotechnol. Bioeng.*, 52, 718-722.
56. Furegon L., Curioni A., (1997), *Process Biochem.*, 32, 113-120.
57. Meng M., Bagdasarian M., Zeikus J. G., (1993), *Bio/Technol.*, 11, 1157-1161.
58. Fujii M., Kawamura Y., (1985), *Biotechnol. Bioeng.*, 27, 260-265.
59. Fujii M., Homma T., Taniguchi M., (1988), *Biotechnol. Bioeng.*, 32, 910-915.
60. Shevelkova A. N., Sinitsyn A. P., (1993), *Biokhimiya*, 58, 1548-1554.

61. Henson C. A., Sun Z., (1995), ACS Symposium Series, 618, 51-58.
62. Cautinho P. M., Reilly P. J., (1994), Protein Engn., 7, 393-400.
63. Kimura T., Ogata M., Kobayashi H., Yoshida M., Oishi K., Nakakuki T., (1990, Bio-technol. Bioeng., 36, 790-796.
64. Shirashi F., Kawakami K., Yuasa A., Kojima T., Kusunoki K., (1987), Biotechnol. Bioeng., 30, 374-380.
65. Houg J.-Y., Chiou J.-Y., Chen K.-C., (1991), J. Chinese Agr. Chem. Soc., 29, 54-60.
66. Hui Z., Wei K., Xiao C., Wei L., Jiacong S., (1992), J. Chem. Tech. Biotechnol., 54, 43-46.
67. Xiao C., Hui Z., Wei L., Jiacong S., (1992), J. Chem. Tech. Biotechnol., 36, 63-74.
68. Schafhauser D. Y., Storey K. B., (1990), Appl. Biochem. Biotechnol., 36, 161-169.
69. Zanin G. M., de Moraes F. F., (1996), Appl. Biochem. Biotechnol., 57/58, 617-625.
70. Prabhakar G., Raju D. C., (1996), Bioproc. Engn., 15, 39-42.
71. Bommarius A. S., (1993), *Biotechnology*, vol.3, *Bioprocessing*, Ed. Stephanopoulos G., VCH Publ., Weinheim, 427-466.
72. Hoshino K., Taniguchi M., Katagiri K., Fujii M., (1992), J. Chem. Eng. Japan, 25, 569-574.
73. Hoshino K., Katagiri K., Taniguchi M., Sasakura T., Fujii M., (1994), J. Ferment. Bio-Eng., 77, 407-412.
74. Pieters B. R., Bardeletti G., Coulet P. R., (1992), Appl. Biochem. Biotechnol., 32, 37-53.
75. Sanroman A., Chamy R., Nunez J., Lema J. M., (1991), Appl. Biochem. Biotechnol., 28/29, 527-538.
76. Abu-Reesh I. M., Faqir N. M., (1996), Bioproc. Engn., 14, 205-210.
77. Kim K. H., Chang H. N., (1986), Biotechnol. Bioeng., 28, 452-455.
78. Cheryan M., Artz W. E., (1989), Enzyme Microb. Technol., 11, 154-159.
79. Sims K. A., Cheryan M., (1992), Biotechnol. Bioeng., 39, 960-967.
80. Houg J. Y., Chiou J. Y., Chen K. C., (1992), Bioproc. Engn., 8, 85-90.
81. Nakajima M., Iwasaki K. I., Nabetani H., Watanabe A., (1990), Agric. Biol. Chem., 54, 2793-2799.
82. Woo G. J., McCord D., (1994), Enzyme Microb. Technol., 16, 1016-1020.
83. Hiromi K., Ohnishi M., Tanaka A., (1983), Mol. Cell Biochem., 51, 79-95.
84. Tanaka A., Takeda S., (1994), Biosci. Biotech. Biochem., 58, 1809-1813.
85. Olsen K., Christensen U., Sierks M. R., Svensson B., (1993), Biochemistry, 32, 9686-9693.
86. Nitta Y., Shirakawa M., Takasaki Y., (1996), Biosci. Biotech. Biochem., 60, 823-827.
87. Mac Gregor E. A., Mac Gregor A. W., Macri L. J., Morgan J. E., (1994), Carbohydr. Res., 254, 249-268.
88. Hiromi K., (1971), Biochem. Biophys. Res. Comm., 40, 1-6.
89. Tanaka A., Takeda S., (1995), Biosci. Biotech. Biochem., 59, 1372-1373.
90. Kondo H., Nakatani H., Matsumo R., Hiromi K., (1980), J. Biochem., 87, 1053-1070.
91. Planchot V., Colonna P., (1995), Carbohydr. Res., 272, 97-109.
92. Mac Gregor A. W., Morgan J. E., Mac Gregor, (1992), Carbohydr. Res., 227, 301-313.
93. Darnoko D., Cheryan M., Artz W. E., (1989), Enzyme Microb. Technol., 11, 151-159.
94. Sanroman A., Chamy R., Nunez M. J., Lema J. M., (1991), Appl. Biochem. Biotechnol., 28/29, 527-538.
95. Coma V., Copinet A., Couturier Y., Prudhomme J. C., (1995), Starch, 47, 100-107.
96. Popa I., (1995), Progress Catal., 4, 39-46.
97. Maxim S., Popa I., (1994), Progress Catal., 3, 27-33.
98. Sanroman A., Murado M. M., Lema J. M., (1996), Appl. Biochem. Biotechnol., 59, 329-336.
99. Zanin G. M., Kambara L. M., Calsavara L. P. V., Moraes F. F., (1994), Appl. Biochem. Biotechnol., 45, 627-640.
100. Madgavkar A. M., Shah Y. T., Cobb J. T., (1977), Biotechnol. Bioeng., 19, 1719-1726.
101. Kim K. H., Cheng H. N., (1986), Biotechnol. Bioeng., 28, 452-455.

102. de Cordt S., Vanhoof K., Hu J., Measmans G., Hendrickx M., Tabback P., (1992), *Biotechnol. Bioeng.*, 40, 396-402.
103. Lecker D. N., Khan A., (1996), *Biotechnol. Prog.*, 12, 713-717.
104. Ray R. R., Jona S. C., Nanda G., (1994), *FEBS Lett.*, 356, 30-32.
105. Vardar-Sukan F., Sukan S. S., Ongen-Baysal G., (1993), *Biotechnol. Lett.*, 15, 657-660.
106. Fabian P., Asboth B., Naray-Szabo G., (1994), *J. Mol. Struct.*, 307, 171-178.
107. Fuxreiter M., Farkas O., Naray-Szabo G., (1995), *Protein Engng.*, 8, 925-933.
108. Nath S., (1996), *Biotechnol. Bioeng.*, 49, 106-110.
109. Fournier R. L., Varanasi S., Byers J. P., Chen G., (1996), *Biotechnol. Bioeng.*, 52, 718-722.

Enzymatic manufacture of maltodextrins and syrup solids from starch. Part II. Processes

Summary

This part mainly discusses enzymatic processes employed in the production of maltodextrins and syrup solids. Functional properties and applications of dextrins, maltose, glucose, fructose, cyclodextrins as well as malto- and isomaltooligosaccharides are presented. Immobilization of amylolytic enzymes and typical enzyme reactors for starch processing is reviewed. Action pattern of amylases in relation to the subsite structure of the enzyme active domains is presented, including: the dependence of Michaelis and molecular activity parameters on the DP of substrate; possible binding modes between the enzyme and a linear substrate; multiple attack mode in addition to simple hydrolysis (random attack). Mathematical modelling of starch degrading processes is critically reviewed. The crucial parameters, influencing the reaction rate and the conversion degree of the substrate, are shown.

Key words:

production of maltodextrins, immobilization, reactors, mathematical modelling.

Adres do korespondencji:

Jolanta Bryjak, Instytut Inżynierii Chemicznej, Politechnika Wrocławska,
ul. Norwida 4/6, 50-373 Wrocław.